



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p><b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, 15/55, 9/22, A61K 31/70</b></p>	<b>A2</b>	<p><b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/05770</b></p> <p><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 12. Februar 1998 (12.02.98)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/01691</p><p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. August 1997 (05.08.97)</p><p><b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 31 919.6      7. August 1996 (07.08.96)      DE</p><p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p><p><b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). GRANZOW, Christof [DE/DE]; Angelweg 16, D-69121 Heidelberg (DE). JOSWIG, Gaby [DE/DE]; Max-Josef-Strasse 21, D-68167 Mannheim (DE). ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnel 20, D-69493 Dossenheim (DE). SCHUBERT, Marie [DE/DE]; Husarenstrasse 16, D-69121 Heidelberg (DE).</p><p><b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p></td><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p><p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p></td></tr></table>			<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/01691</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. August 1997 (05.08.97)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 31 919.6      7. August 1996 (07.08.96)      DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). GRANZOW, Christof [DE/DE]; Angelweg 16, D-69121 Heidelberg (DE). JOSWIG, Gaby [DE/DE]; Max-Josef-Strasse 21, D-68167 Mannheim (DE). ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnel 20, D-69493 Dossenheim (DE). SCHUBERT, Marie [DE/DE]; Husarenstrasse 16, D-69121 Heidelberg (DE).</p> <p><b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/01691</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. August 1997 (05.08.97)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 31 919.6      7. August 1996 (07.08.96)      DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). GRANZOW, Christof [DE/DE]; Angelweg 16, D-69121 Heidelberg (DE). JOSWIG, Gaby [DE/DE]; Max-Josef-Strasse 21, D-68167 Mannheim (DE). ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnel 20, D-69493 Dossenheim (DE). SCHUBERT, Marie [DE/DE]; Husarenstrasse 16, D-69121 Heidelberg (DE).</p> <p><b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p><b>(54) Title:</b> ANTISENSE RNA WITH A SECONDARY STRUCTURE</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> ANTI-SINN-RNA MIT SEKUNDÄRSTRUKTUR</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>An antisense RNA with special secondary structures is disclosed, as well as a combination of the antisense RNA and of a (ds)RNase. The antisense RNA and its combination may be used to inhibit gene expression.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen sowie eine Kombination umfassend die Anti-Sinn-RNA und eine (ds)RNase. Die Anti-Sinn-RNA und die Kombination können zur Hemmung der Genexpression verwendet werden.</p>				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur, eine sie enthaltende Kombination sowie die Verwendung beider.

5 Neue Techniken zur Hemmung der Genexpression umfassen häufig den Einsatz von Anti-Sinn-RNA. Dies ist eine RNA, die zu Bereichen der mRNA eines Gens komplementär ist und an diese bindet. Es entsteht ein Duplexmolekül, das der Translation der mRNA entzogen ist. Damit kann eine Hemmung der Genexpression erreicht werden.

10 Es hat sich allerdings gezeigt, daß das Duplexmolekül häufig nicht stabil ist, d.h. die mRNA wird wieder frei für die Translation, wodurch die Hemmung der Genexpression schwach ist oder gar nicht eintritt.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem eine starke Hemmung der Genexpression erzielt werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen erreicht.

20 Mit dem Ausdruck "besonderer Sekundärdruck" ist gemeint, daß es sich nicht um eine natürlich vorkommende Sekundärstruktur handelt, sondern daß diese künstlich erzeugt worden ist.

25 Der Ausdruck "Anti-Sinn-RNA" umfaßt jegliches RNA-Molekül, das sich als Anti-Sinn-RNA eignet, d.h. komplementär zu Bereichen einer RNA, insbesondere mRNA und ganz besonders Regulationselementen dieser, ist und durch Bindung an diese Bereiche eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Die Anti-Sinn-RNA kann auch DNA-Sequenzen umfassen. Ferner kann die Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann

ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die Anti-Sinn-RNA kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht.

5

Der Ausdruck "Sekundärstruktur" umfaßt jegliche DNA- und/oder RNA-Sequenz, die in einer Anti-Sinn-RNA vorliegen kann und eine zumindest teilweise "Hairpin"-Struktur aufweist, d.h. einzelne Basenpaare unterliegen einer Rückfaltung. Die Sekundärstruktur kann innerhalb der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Auch kann sie am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Liegen mehrere Sekundärstrukturen vor, können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Vorzugsweise ist die Sekundärstruktur eine  $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ -,  $(AT)_n$ -Palindrom- $(AT)_n$ -, oder  $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn  $n = 20$  und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist. Bevorzugt sind auch komplizierte Palindrome wie  $(AGCT)_n$  oder  $(GAATTC)_n$ .

10

15

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist es, durch Oligonukleotidsynthese eine doppelsträngige  $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$ -Sequenz herzustellen und diese an das 5'-Ende der cDNA-Sequenz eines zu hemmenden Gens zu ligieren. Das erhaltene DNA-Molekül wird in 3'→ 5' Richtung an den Promotor eines Vektors ligiert. Der erhaltene Vektor führt zur Expression der erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA. Ergänzend wird auf Sambrook, Fritsch, Maniatis, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, verwiesen.

20

25

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors in Zellen eingebracht werden. Die Zellen können jegliche Zellen, wie Pflanzen- und tierische, insbesondere Säugetier- und ganz besonders menschliche Zellen, sein. Die Zellen können innerhalb eines Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen. Letztere können frisch isoliert oder in Kultur gehalten sein. Das Einbringen der Anti-Sinn-RNA in die Zellen kann durch übliche Transfektionstechniken, wie Elektroporation, erfolgen.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase. Dies ist eine RNase, die doppelsträngige RNA erkennen und abbauen kann. Eine (ds)RNase findet sich z.B. in dem Hefestamm *Schizosaccharomyces pombe* (pac1 +). In der Kombination kann die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ebenso kann die (ds)RNase als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die (ds)RNase kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn die Kombination darin besteht, daß ein Vektor vorliegt, der sowohl für die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als auch für die (ds)RNase kodiert. Hinsichtlich des Vektors wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase kann in Zellen eingebracht werden. Hinsichtlich der Zellen und des Einbringens der Anti-Sinn-RNA wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Die (ds)RNase kann als solche, d.h. als Protein, durch übliche Verfahren, wie Lipofektion, eingebracht werden. In Form eines sie kodierenden Vektors kann die (ds)RNase durch Verfahren eingebracht werden, wie sie für die Anti-Sinn-RNA genannt wurden.

Die vorliegende Erfindung stellt eine Anti-Sinn-RNA und eine sie enthaltende Kombination bereit, die eine starke Hemmung der Genexpression bewirken. Die vorliegende Erfindung findet somit eine breite Anwendung in der Molekularbiologie und der Medizin. Insbesondere kann an die Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen gedacht werden, bei denen einzelne Proteine auslösend oder verstärkend sind. Dies sind z.B. Erkrankungen, bei denen Hormone eine große Rolle spielen, Tumorerkrankungen und virale Infektionen, wie HIV und AIDS.

**Kurze Beschreibung der Zeichnung**

Fig. 1 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (3) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur II.

Fig. 2 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I und einer (ds)RNase.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung von Expressions-Vektoren, die das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen in 5'→3' bzw. 3'→5' Richtung enthalten.**

Das CAT-Gen wurde aus einem üblichen CAT-Vektor isoliert und in die "multiple cloning site" des Expressionsvektors pJ3Ω (vgl. Nucleic acids res. 18, (1990), 1068) inseriert. In einem Fall erfolgte die Insertion in 5'→3' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-CAT erhalten. Im anderen Fall erfolgte die Insertion in 3'→5' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC erhalten.

**Beispiel 2:** Herstellung von Expressionsvektoren, die das CAT-Gen in 3' → 5' Richtung und eine für eine Sekundärstruktur I bzw. II kodierende Sequenz enthalten.

- 5 (A) Expressionsvektor mit einer  $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$ -Sequenz am 5'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur I)

1. Herstellung einer  $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$ -Sequenz.

- 10 (a) Mittels eines automatischen Synthese-Geräts (Oligonukleotid-Synthesizer) wurden 2 Oligodesoxynukleotide hergestellt:

AATTC- $(GC)_{20}$ -G

und

15 G- $(GC)_{20}$ -CTTAA

- (b) Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf 90°C erhitzt, danach langsam unter "annealing"-Bedingungen auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei entstand ein DNA Dopplestrang folgender Struktur:
- 20

AATTC- $(GC)_{20}$ -G

\* \*\* \*

G- $(GC)_{20}$ -CTTAA

- 25 (c) Unter Ligationsbedingungen entstanden Vielfache der in (b) beschriebenen DNA

AATTC- $(GC)_{20}$ -GAATTC- $(GC)_{20}$ -GAATTC- $(GC)_{20}$ -G.....

\* \*\* \* \* \* \* \*

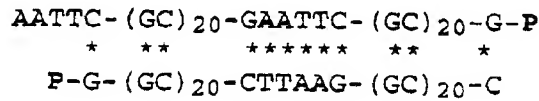
G- $(GC)_{20}$ -CTTAAG- $(GC)_{20}$ -CTTAAG- $(GC)_{20}$ -CTTAA...

30

- (d) Die Ligationsprodukte wurden durch Gelelektrophorese nach

Größe aufgetrennt und eine Sequenz, bestehend aus Dimeren, wurde aus dem Gel eluiert und mittels Polynukleotidkinase /ATP phosphoryliert.

5



10

- (e) Diese Sequenz wurde zunächst in die EcoRI-Stelle des üblichen Klonierungsvektors pBluescript (Stratagene) eingesetzt, aus dem sie durch geeignete Restriktionsenzyme zur Umklonierung in den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→5' Richtung aufweist, entnommen werden konnte.

15

**2. Einbau der (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub> Sequenz in den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→5' Richtung aufweist.**

20

Der Vektor pJ3Ω-TAC von Beispiel 1 wurde in der "multiple cloning site" zwischen dem Promotor und der TAC-Insertion mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub> Sequenz wurde mit den entsprechenden Enzymen aus dem pBluescript-Vektor von Beispiel 2(e) entnommen. Die beiden Nukleinsäuren wurden per Ligation verbunden. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC-Sek. I erhalten.

25

**(B) Expressionsvektor mit einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz am 3'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur II).**

30

Die unter Beispiel 2 (A) hergestellte (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz wurde in den Vektor pJ3Ω-TAC am 3'-Ende des TAC-Gens eingesetzt. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC-Sek.II erhalten.



**Beispiel 3: Herstellung eines Expressionsvektors, der für eine (ds) RNase kodiert.**

5 Aus einer üblichen genomischen Bibliothek von *Schizosaccharomyces pombe* wurde mittels einer PCR-Amplifikation das für eine (ds)RNase kodierende Gen (*pac1* + ) isoliert. Hierzu wurden Primer verwendet, die aus der bekannten Sequenz des Gens *pac1* + (vgl. Datenbank: embl: S78982) abgeleitet worden waren. Das Gen *pac1* + wurde in dem bekannten Vektor pBluescript kloniert und  
10 durch Sequenzierung bestätigt. Nach Umklonierung in den üblichen Expressionsvektor pcDNA3 (InVitrogen) wurde der Expressionsvektor pcDNA3-*pac1* + erhalten.

**Beispiel 4: Hemmung der Genexpression durch eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur**

15 (a) Ehrlich Ascites Tumorzellen ( $10^7$  Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3 $\Omega$ -CAT, pJ3 $\Omega$ -TAC, pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I bzw. pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. II transfiziert (vgl. Tabelle 1). Die  
20 Transfektion wurde mittels Elektroporation (366V/950 $\mu$ F/Elektrodenabstand D = 4mm) durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und Aliquote mit radioaktiv markiertem Chloramphenicol inkubiert. Es wurde  
25 die Konversionsrate (in Ac-, Di-Ac-Chloramphenicol) nach DC durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

- 8 -

**Tabelle 1:**

	1	2	3
5 pJ3Ω-CAT	3μg	3μg	3μg
pJ3Ω-TAC	7,5μg	-	-
pJ3Ω-TAC-Sek. I	-	7,5μg	-
10 pJ3Ω-TAC-Sek. II	-	-	7,5μg

Aus Fig. 1 geht hervor, daß durch Transfektion von pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pJ3Ω-TAC-Sek. II (vgl. Fig. 1, (2), (3)) eine stärkere Hemmung der Expression des CAT-Gens erreicht werden kann, als wenn pJ3Ω-TAC (vgl. Fig. 1, (1)) verwendet wird.

(b) Ehrlich Ascites Tumorzellen ( $10^7$  Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3Ω-CAT, pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pcDNA3-pac1 + transfiziert (vgl. Tabelle 2). Die Transfektionsbedingungen waren wie in Beispiel 4 (a) beschrieben.

**Tabelle 2:**

	1	2
25 pJ3Ω-CAT	5μg	5μg
pJ3Ω-TAC-Sek. I	10μg	10μg
pcDNA3-pac1 +	-	10μg

Aus Fig. 2 geht hervor, daß durch Kotransfektion von pJ3Ω-TAC-Sek. I mit pcDNA3-pac1 + (vgl. Fig. 2 (2)) eine stärkere Hemmung der Expression von CAT erhalten wird, als wenn pJ3Ω-TAC-Sek. I (vgl. Fig. 2, (1)) alleine verwendet wird.

5

Somit wird deutlich, daß eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur eine größere Hemmwirkung auf die Genexpression hat als eine Anti-Sinn-RNA ohne Sekundärstruktur. Ferner wird deutlich, daß die Hemmwirkung der Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur noch gesteigert werden kann, wenn zusätzlich zu gegebenenfalls natürlich vorhandenen (ds)RNAsen eine (ds)RNAse-Aktivität mittels der beschriebenen Verfahren hervorgerufen bzw. erzeugt wird.

**Patentansprüche**

1. Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen.
2. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA geschaffen worden ist.  
5
3. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur eine  $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ - oder  $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz ist.  
10
4. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß  $n = 20$  und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist.
5. Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Anti-Sinn-RNA durch einen Vektor kodiert ist.  
15
6. Kombination, umfassend die Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und eine (ds)RNase.
7. Kombination nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anti-Sinn-RNA und die (ds)RNase durch einen oder mehrere Vektoren kodiert sind.  
20
8. Verwendung der Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und der Kombination nach Anspruch 6 oder 7 zur Hemmung der Genexpression.  
25

1/2

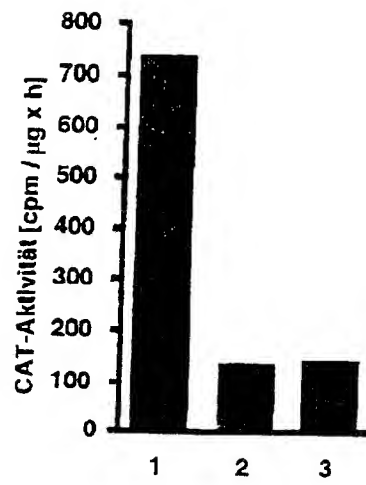


Fig. 1

2/2

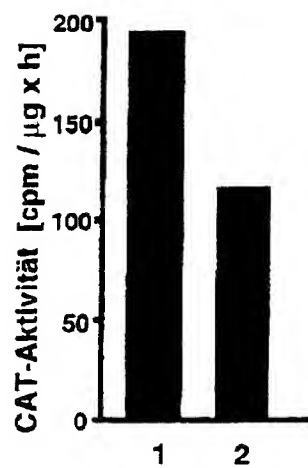


Fig. 2